

2002;13:1127-9.

- 3) Takeda T, et al. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear Res.* 2000;140:1-6.
- 4) Takeda T, et al. The effects of V2 antagonist (OPC-31260) on endolymphatic hydrops. *Hear Res.* 2003;182:9-18.

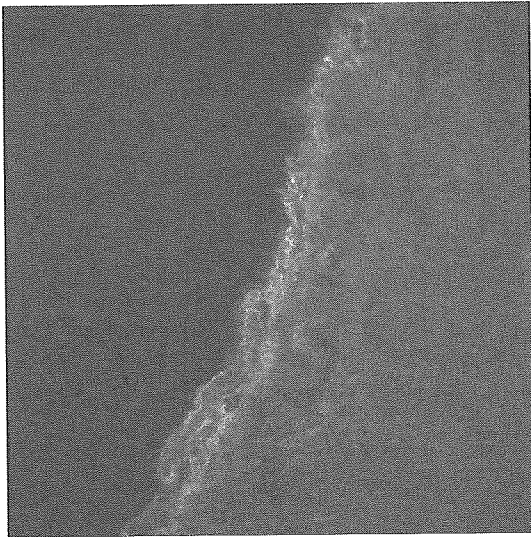


図 1. AQP2 の発現

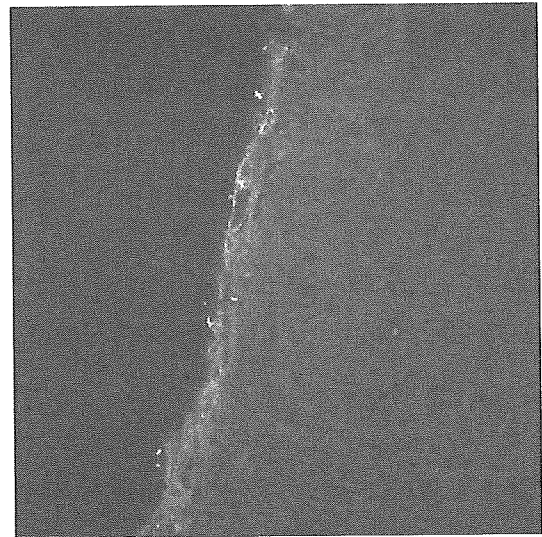


図 2. AQP3 の発現

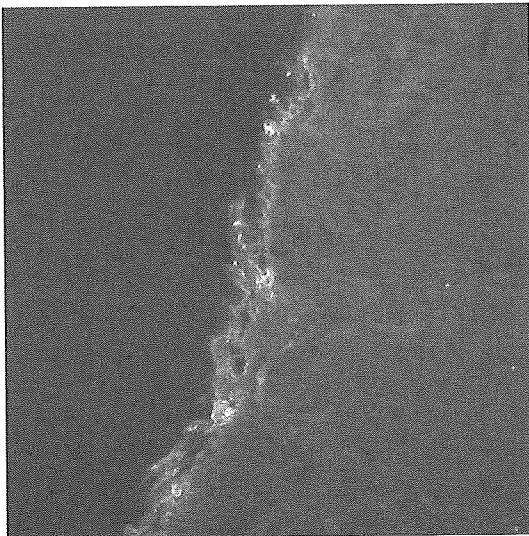


図 3. AQP4 の発現

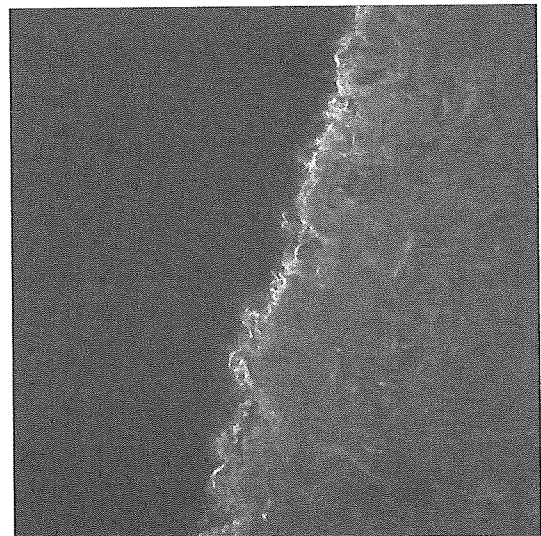


図 4. Vasopressin type 2 receptor の発現

5. 内耳における Aquaporin-6 の局在

田口大藏, 西岡利恵, 柿木章伸, 竹田泰三
(高知大学耳鼻咽喉科)

[はじめに]

メニエール病の病理組織学的特徴は内リンパ水腫であり, 水チャネル発現の変化などによる水代謝異常が原因と考えられている. 蝸牛や内リンパ囊においては, Aquaporin-6(AQP6)が mRNA レベルで発現していることが報告されているが, 蛋白レベルでの局在はいまだ不明であり, その役割は明らかではない. 今回われわれは, ラット内耳における AQP6 蛋白の局在について検討した.

[対象と方法]

Wistar 系ラット 1 匹(2 耳)を用いた. ペントバルビタール深麻酔後にリン酸バッファー(PBS)で経心灌流し, 続いて 4%パラフォルムアルデヒド(PFA)+PBS で灌流した. 直ちに内耳を摘出し, 4%PFA+PBS で 4°C overnight で固定した. 0.12M EDTA で脱灰後に Tissue Tek に包埋し, クライオスタットで薄切(7 μ m)した. 10%正常ヤギ血清でインキュベート後, 一次抗体で 4°C overnight し, 続いて二次抗体(Alexa 546 anti-rabbit IgG)で 6 時間インキュベートした. 50%グリセロールでマウントし, 共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss, LSM410)にて鏡検した.

[結果]

蝸牛においては, コルチ器および血管条に AQP6 が分布していた(図 1). 内リンパ囊においては内腔上皮に分布していた(図 2). 前庭においては, 平衡斑感覚上皮に分布していた(図 3).

[考察]

われわれはこれまで, 内耳での AQP の発現について報告してきた. AQP6 は, 実験動物では腎臓および内耳で少なくとも mRNA レベルでは発現することが確認されている. 腎臓では集合管の介在細胞に¹⁾, 内耳では蝸牛および内リンパ囊に²⁾分布することが報告されている. 一般に, AQP 蛋白は細胞膜表面に局在しているが, AQP6 は細胞内小胞に局在しており, 水代謝だけでなくイオン代謝にも関与していると考えられている. AQP6 は内耳や腎臓といった, 水が動く臓器に分布するため, 内リンパ液の代謝に関与している可能性が考えられる. 今回われわれは, 免疫組織化学的手法により, ラット内耳における AQP6 の局在を初めて報告した. AQP6 の内耳における役割は今後さらなる検討を要すると思われる.

[参考文献]

- 1) Yasui M, et al. Aquaporin-6 : An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia Proc. Natl. Acad. Sci. 1999;96(10): 5808-13.
- 2) Fukushima M, et al. Effects of intratympanic injection of steroids on changes in rat inner ear aquaporin expression. Acta Otolaryngol. 2002;122(6):600-6

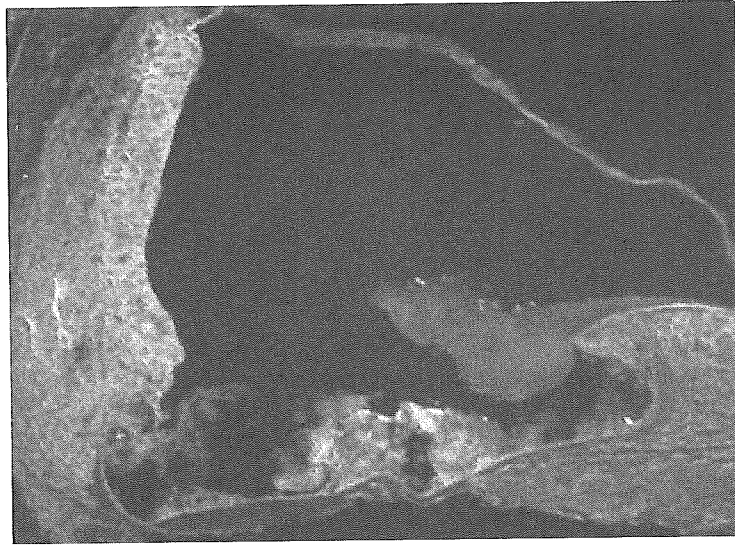


図 1. 蝸牛での AQP6 の局在

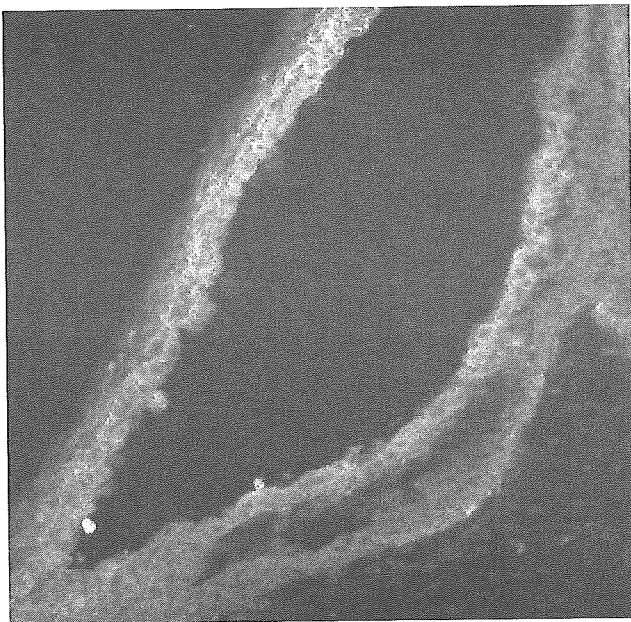


図 2. 内リンパ嚢での AQP6 の局在

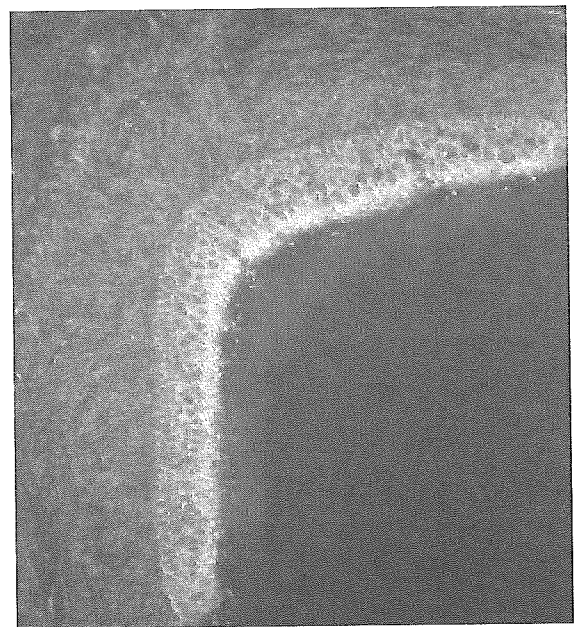


図 3. 平衡斑での AQP6 の局在

6. 血管条における水チャネルの発現

西岡利恵, 田口大藏, 柿本章伸, 竹田泰三
(高知大学耳鼻咽喉科)

[はじめに]

メニエール病の病理組織学的特徴は内リンパ水腫であり, メニエール患者では血漿抗利尿ホルモン値が高く¹⁾, またモルモットに抗利尿ホルモンを投与すると内リンパ水腫が形成される²⁾ことから, 内耳液の恒常性維持には抗利尿ホルモンの関与が予想される. 抗利尿ホルモン (VP) は, 腎臓の集合管に存在するレセプター (V2R) に結合することにより, 水チャネル (アクアポリン: AQP) を発現させ, 水の再吸収を行う. 内耳にもV2RとAQPの存在が予想され, 実際RT-PCRによりmRNAの存在は確認されている³⁻⁸⁾. しかしながら, その局在については不明なため, 今回これを検討した.

[対象と方法]

Wistar系ラットを用いた.

1) RT-PCR

ペントバルビタール深麻酔下に蝸牛組織を採取し, total RNAを抽出し (RNeasy Mini Kit, Qiagen), 逆転写にてcDNAを作成した (Superscript II, Invitrogen). V2R, AQP2, AQP3とAQP4に対する特異的 primerを用いて, PCRを施行した. (Hot star Taq, Qiagen). PCR産物は3%アガロースゲルにて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドにてバンドを確認した.

2) 免疫組織

ペントバルビタール深麻酔下に4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定し, 蝸牛組織を採取後さらに固定, 脱灰 (10%EDTA), スクロース浸透後包埋 (OCTコンパウンド) し, 凍結切片 (10 μ m厚) を作成した. 免疫染色の一次抗体は全て市販のケミコン社製を用いた. 切片は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した.

[結果]

- 1) RT-PCRではV2R, AQP2, AQP3及びAQP4のそれぞれに特異的バンドが観察された (図1).
- 2) 免疫組織的研究で血管条の基底細胞にV2R, AQP2及びAQP3が存在し, AQP4はヘンゼン, クラウディウス細胞及び内螺旋細胞に存在していた (図2-5).

[考察]

内耳蝸牛へのAQPの発現については, 過去の報告と同様にRT-PCRで確認できた. また, その局在については, 様々な報告があるが⁹⁾, V2R, AQP2およびAQP3の血管条への発現の報告はない. 血管条においては, 以前我々が報告した血管条中間細胞へのAQP1の存在¹⁰⁾, 辺縁細胞基底側のNaK2C1共輸送体及び他論文での辺縁細胞頂側へのAQP7の存在が知られている. 今回水を動かす要因のひとつであるバゾプレシンのレセプターであるV2RとAQP2及びAQP3が基底細胞にみられたことから, 血管条を介した内リンパへの水の流れの存在が考えられる. メニエール病の病理組織学的特徴である内リンパ水腫の形成に抗利尿ホルモンと水チャネルが深く関与していると予想さ

れる。

[参考文献]

- 1) Takeda T, Kakigi A, Saito H : Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 519 : 219-222, 1995.
- 2) Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada S, Kakigi A : Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear. Res.* 140 : 1-6, 2000.
- 3) Beitz E, Kumagami H, Krippeit-Drews P, Ruppertsberg J P, Schultz J E : Expression pattern of aquaporin water channels in the inner ear of the rat. The molecular basis for a water regulation system in the endolymphatic sac. *Hear Res.* 132 : 76-84, 1999.
- 4) Huang D, Chen P, Chen S, Nagura M, Lim D J, Lin X : Expression patterns of aquaporins in the inner ear; evidence for concerted actions of aquaporins to facilitate water transport in the cochlea. *Hear Res.* 165 : 85-95, 2002.
- 5) Kitano H, Takeda T, Suzuki M, Kitanishi T, Yazawa Y, Kitajima K, Kimura H, Tooyama I : Vasopressin and oxytocin receptor mRNAs are expressed in the rat inner ear. *Neuroreport* 8 : 2289-2292, 1997.
- 6) Kitano H, Suzuki M, Kitanishi T, Yazawa Y, Kitajima Y, Isono T, Takeda T, Kimura H, Tooyama I : Regulation of inner ear fluid in the rat by vasopressin. *Neuroreport.* 10 : 1205-1207 1999..
- 7) Mhatre A N, Jero J, Chiappini I, Bolasco G, Barbara M, Lalwani A K : Aquaporin-2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Meniere's disease. *Hear Res.* 170 : 59-69, 2002.
- 8) Sawada S, Takeda T, Kitano H, Takeuchi S, Kakigi A, Azuma H : Aquaporin-2 regulation by vasopressin in the rat inner ear. *Neuroreport* 13 : 1127-1129, 2002.
- 9) Zhong S X, Liu Z H : Expression of aquaporins in the cochlea and endolymphatic sac of guinea pig. *ORL* 65 : 284-289 : 2003.
- 10) Sawada S, Takeda T, Kitano H, Takeuchi S, Okada T, Ando M, Suzuki M, Kakigi A : Aquaporin-1 (AQP1) is expressed in the stria vascularis of rat cochlea. *Hearing Res* 181; 15-19, 2003.

RT-PCR

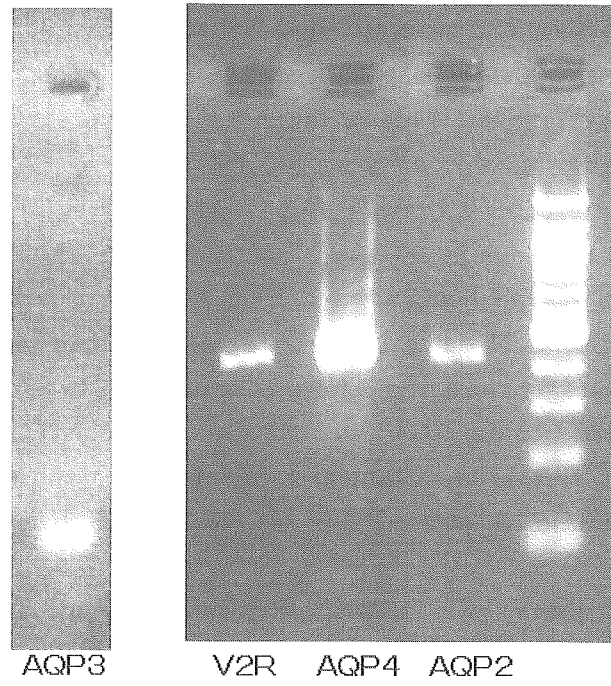


图 1

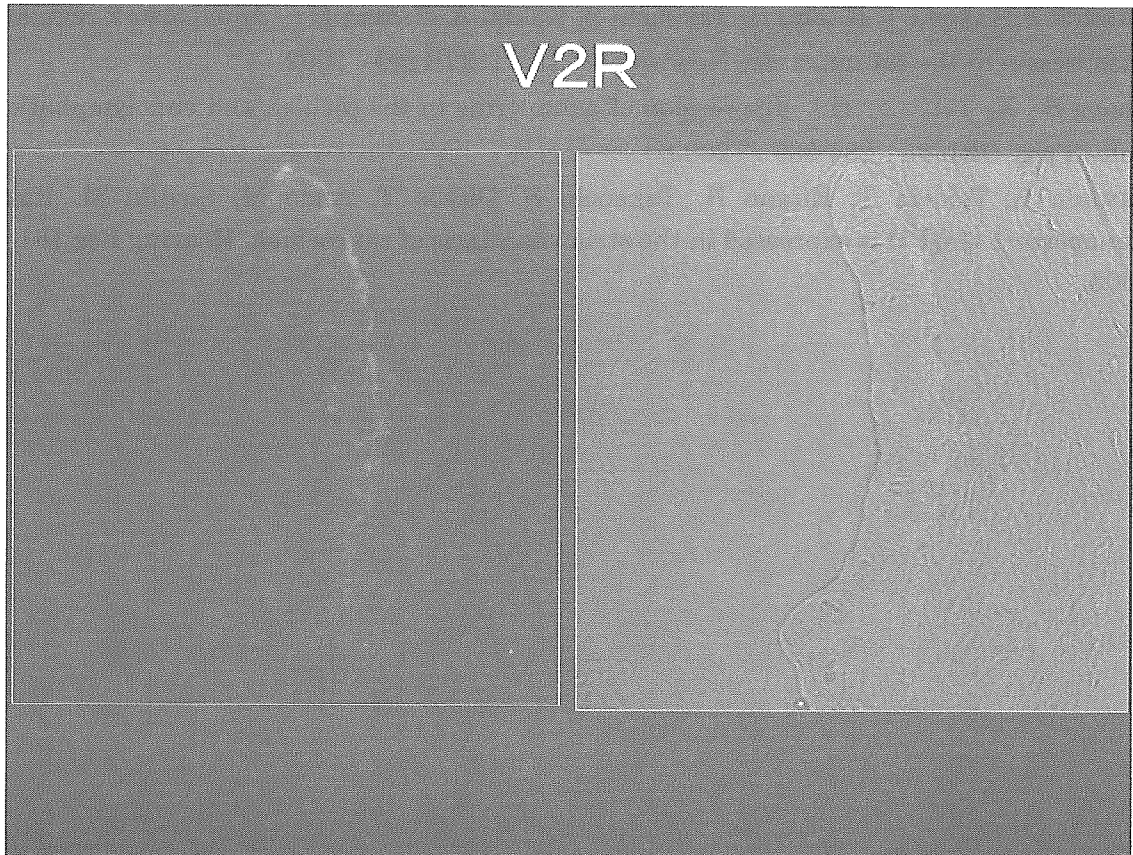


图 2

AQP2

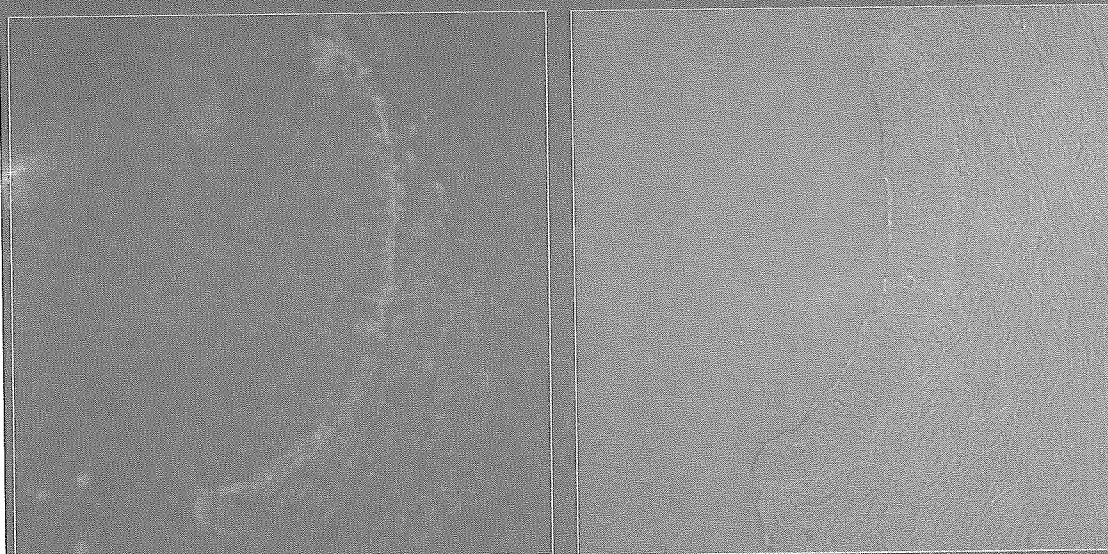


图 3

AQP3

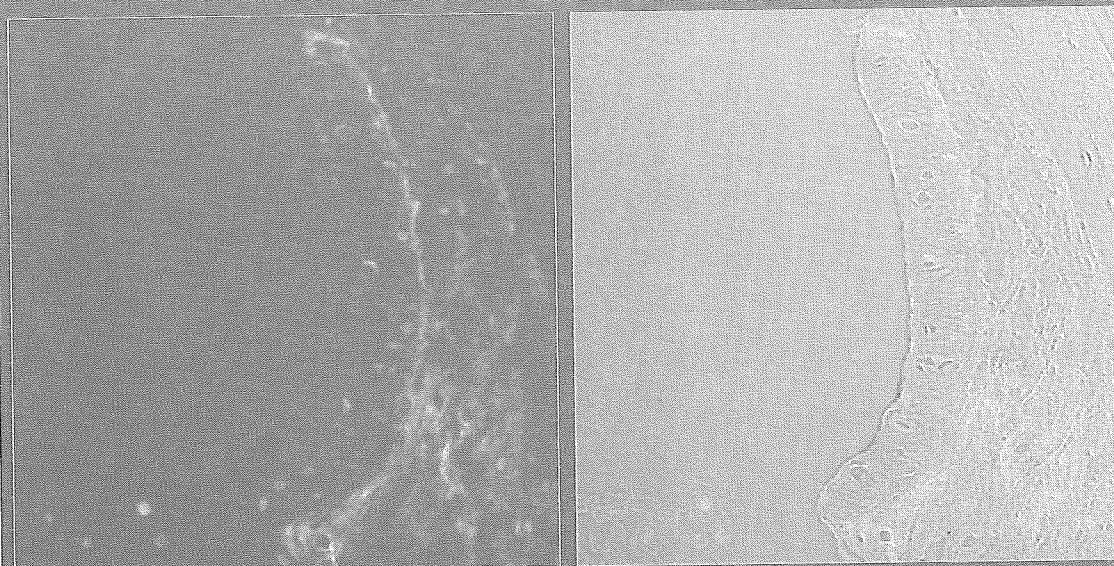


图 4

AQP4

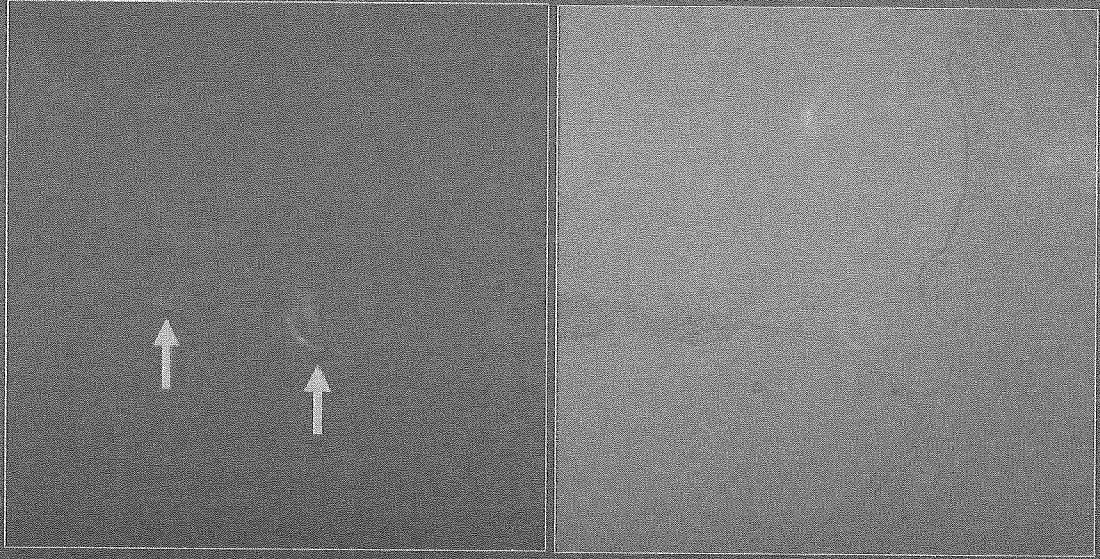


图 5

7. 遅発性内リンパ水腫と診断されていた内耳 3rd Mobile Window 症例

池園哲郎, 関根久遠, 中澤裕子, 新藤 晋, 八木聰明
(日本医科大学耳鼻咽喉科)

【はじめに】

superior semicircular canal dehiscence syndrome (SCDS), 外リンパ瘻, 真珠腫による迷路破壊は, 内耳に 3rd Mobile Window が生じたことにより迷路に病的な刺激が加わることがその本態である. このため様々な蝸牛・前庭症状をきたす¹⁾.

今回我々は, 「外傷性」外リンパ瘻により一側聾となり, その後遅発性に反復性めまいを発症, 遅発性内リンパ水腫と診断され加療されていた症例を経験した. 患者は, めまいのため就労困難で離職していた. 骨迷路骨折線の修復により症状は劇的に改善した.

【対象と方法】

下記症例の病歴, 検査結果, 治療, 治療後の症状の改善を検討した.

症例 29 歳男性

<現病歴>

9 歳: 交通事故で左側頭部を強打し数日間意識障害があった. 外傷性尿崩症, 髄膜炎, 側頭骨骨折を認めた. 受傷後, 左聾, 左顔面神経麻痺, 左外斜視が後遺症として残ったが, 通常の生活を送っていた.

27 歳 3 ヶ月: 突然誘因なくめまい, ふらつき, ふわふわ感出現.

27 歳 4 ヶ月: A 病院院脳外科で低髄圧症候群と診断され blood patch を受けたが改善せず.

27 歳 5 ヶ月: B 病院院脳外科で左後頭蓋開頭髄液漏閉鎖術を受け, ふわふわ感は改善したが, 強大音を聞いた時やエレベーターに乗った際のめまいが持続した.

28 歳 8 ヶ月: C 病院耳鼻咽喉科で, 遅発性内リンパ水腫と診断されイソバイド, メチコバル, サーマオンを内服するが改善せず. さらに心因性めまいと診断されドグマチール処方される

・29 歳 3 ヶ月: 当科受診

<検査所見>

初診時の聴力検査: 右正常, 左聾. 眼振検査では全頭位で右向き水平回旋混合性眼振を認めた. 両耳とも Fistel sign は陰性であった.

再診時には眼振を認めず. 左耳 Fistel sign 陽性, 眼振が誘発されめまい感の自覚もあった. カロリックテスト(20°C): 右 19.4°/sec. 左 0°/sec.であった.

側頭骨ターゲットCTでは, 両側乳突洞発育良好. 左側頭から後頭部に前回手術による骨欠損を認めた. 左前半規管, 前庭に骨折線を認めた. 左アブミ骨底板にも骨折が疑われる所見あり. 左耳小骨連鎖は保たれ, 右内耳には明らかな異常なし. 両側内耳道正常であった.

<診断>

初診時の印象ではあたかも心因性疾患のような印象がつよかった. ストレスについて問診すると, めまいにより就業できないことが最大のストレス源であり, 「病気が最大のストレス」だと訴えた.

数回の再診診察時にも訴えが一貫しており, 単なる心因性めまいや詐病とは思えなかったためCT検査を施行したところ, 上記のように左前庭から半規管にかかる骨折線を認めた. さらに瘻孔症状陽性, チュリオ現象陽性で外傷性左外リンパ瘻と診断した. 発症の経緯からすると遅発性・慢性外リンパ瘻に

分類される。

<治療>

耳後部からアプローチし乳突洞削開術，Posterior tympanotomyを行った。キヌタ，ツチ骨頭を除去して，三半規管を浮き彫りにした。前半気管の前側を鏡を用いて観察すると，前庭方向へのびる骨折線を認めた。骨折線を骨パテと筋膜で覆い，フィブリン糊で固定した。

<術後経過>

術直後より左眼球の違和感が消失し，強大音でのめまい発作は消失，ふらふら感も改善し退院した。聴力は改善を認めなかった。

患者本人が記した症状の変化を以下に示す。

(術前の症状) エレベーターや車に乗ると，車酔いのようにひどく気分が悪くなり，頭痛，降りると歩行がふらつき，体が回されるような状態になる。気持ち悪くなり，眼を開けていられない感じになる。特にエレベーターに乗り，降りた後には地面が上下に激しく揺れているようなめまい発作が起きる。

突発的・不意に大きな音や高い音を聞くと響き，車酔いのように気分がひどく悪くなり，歩行がふらつき，体が回されるような状態になる。その際，眼を開けていられない感じになる。以前発作を誘発した音は，チャイム，バイク，食器があたる音，子供の泣き声などであった。

左眼の瞳の位置を自分の意思でコントロールすることができずに，勝手に左外側へスライドしたり中心に戻ろうとする。像が流れてかすんだ状態になる。その際に歩行がふらつき，酔ったような気分の悪さ，眼の気持ち悪さを感じる。左眼では焦点を合わせづらく一箇所を注視することができず，焦点が合ったりぼけたりを繰り返す。一旦これらの症状がでると，しばらく睡眠をとらないと治らない。

(術後の改善) エレベーターの乗り降りでは多少フワツとする。他人の車に乗ると頭痛がする症状は残っているが，降りた時に気分の悪さ，ふらつきなど，めまい症状は起きなくなった。

現在音が耳に響くことはなく，音に誘発されるめまい発作は起きない。

術後は左眼のスライドがなくなり，ふらつき・気分の悪さはなくなった。焦点の合わせづらさは少し残っているが以前よりも改善されている。

[考案]

superior semicircular canal dehiscence syndrome (SCDS)，外リンパ瘻，真珠腫による迷路破壊は，いずれも 3rd Mobile Window が原因となる症状を呈する。このため様々な蝸牛・前庭症状をきたす。

本症例は，遅発性・慢性の経過をたどる外傷性外リンパ瘻の典型例である。術中に中耳，乳突洞を生理食塩水で洗浄し，外リンパ特異的蛋白 C T P の有無を検討したが，結果は陰性であった。漏出は止まっているが 3rd Mobile Window (漏れていない瘻孔) が存在し，めまいの原因となっていたと考えられる(2-5)。

カロリックテストは左無反応であった。カロリックテストは主に外側半規管の機能を調べる検査であり，その他の半規管および耳石機能については判定は出来ない。エレベーターでの症状などから推測すると，VEMP 等の耳石機能検査は行なっていないものの，耳石機能障害が関与していた可能性が高い。

また，このような長期めまい症状に悩まされていた症例においては，手術治療のプラセボ効果が少なからず存在することが考えられる。しかし，過去の 2 回の脳外科の手術では改善が得られず，今回の内耳瘻孔閉鎖手術で著明に症状が改善したことは，めまい症状が左内耳機能障害に起因し，瘻孔の閉鎖により改善した可能性が非常に高いことを示唆している。

また，内耳に対する微妙な刺激症状 (3rd Mobile Window 刺激) は患者をいらいらさせ，あたかも心因性疾患のような印象を与えることにも留意すべきと考えられた。

【結論】

遅発性内リンパ水腫はあくまで除外診断である。めまい発作や繰り返す蝸牛症状は、その頻度は少ないものの、慢性外リンパ瘻の可能性を考えて、外傷の既往の問診をする必要があり、それがめまいの原因になっていないか慎重に検討するべきである。

本症例のように、治療出来る器質的疾患の鑑別が慢性めまい患者の利益になることは言うまでもない。

【参考文献】

- 1) Minor LB: Labyrinthine fistulae: pathobiology and management *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 Oct;11(5):340-6
- 2) Fitzgerald DC: Head trauma; Hearing loss and dizziness. *J Trauma* 40(3): 488-496, 1996.
- 3) 池園哲郎: 外リンパ瘻の診断マーカーとしての Cochlin-Tomoprotein(CTP). *臨床検査* 49(11): 1259-1263, 2005.
- 4) 池園哲郎: 聴力改善手術 7.外リンパ瘻. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 77, No.(5): 162-173, 2005.
- 5) 池園哲郎 メニエール病と外リンパ瘻 内耳窓閉鎖術で改善する慢性外リンパ瘻を見逃さないために めまい診療のコツと落とし穴 p30-31 中山書店 2005.5.30 発行

8. 生後ラット内耳発達過程における Cochlin 発現の検討

新藤 晋, 池園哲郎, 李 麗淑, 関根久遠, 渡邊 淳, 八木聰明
(日本医科大学耳鼻咽喉科)

【はじめに】

Cochlin^{1) 2) 3) 4)} は非症候性遺伝性難聴のひとつ, DFNA9 の病因蛋白である. DFNA9 は临床上, 30~40 代から発症する感音難聴で, 徐々に進行し高度感音難聴になる. 前庭障害は蝸牛同様, 緩徐に進行するため, めまいの特徴は回転性, 浮動性めまいを呈する. またメニエール病に類似した症候を呈するケースもある, 非常にユニークな疾患である. 我々は Cochlin に着目して研究を行ない, ①4つの分子量の異なるアイソフォームを持つこと. ②Cochlin が内耳にほぼ特異的に発現していること. ③Cochlin のアイソフォームのひとつ, CTP (Cochlin-tomo-protein)が外リンパ瘻の生化学的診断法として臨床応用可能であることを報告してきている. ⑥)

Cochlin は内耳蛋白の約 70%を占めるという, 内耳に非常に豊富に存在する蛋白であるが, 機能についてはまだほとんどわかっていない. そこで我々は Cochlin の機能を解析する一助として Cochlin の空間的な発現(spatiotemporal expression)について研究を行った.

【対象と方法】

使用抗体

Cochlin は分子量によって p63, p44, p40 と CTP の計 4 種類のアイソフォームがある. このうち内耳組織に発現しているのは, CTP 以外の 3 つのアイソフォームである. 今回は Cochlin のアイソフォームのうち, p63, p44, p40 を認識する抗 Cochlin 抗体を使用した.

①: 免疫染色

使用動物; Wister 系ラット 生後 6 日目 (n=4), 生後 16 日目 (n=4), 成獣 (n=4)

方法; ペントバルビタールを腹腔内投与して深麻酔後に断頭した. 4%PFA で固定し, 10%EDTA で脱灰, パラフィン包埋しブロックを作成した. その後 4 μ m の薄切切片を作成した. 抗 Cochlin 抗体を一次抗体として ABC 法 (DAB 発色) で免疫染色を行なった.

②: ウェスタンブロット

使用動物; Wister 系ラット 生後 6 日目 (n=4), 生後 13 日目 (n=2), 生後 17 日目 (n=2), 生後 20 日目 (n=2), 生後 24 日目 (n=2) を使用

方法; 断頭後, 速やかに内耳組織を採取. サンプルは蛋白量の均一化を測るため, BCA法を用いて蛋白濃度を測定後, 各群のサンプル濃度を 0.5 μ g/ μ l とした. ウェスタンブロットは, 各タイムポイントとも, 2 μ l (1 μ g) を使用. 一次抗体に抗 Cochlin 抗体を使用し, 発色には ECL advance キット (アマシヤム社製) を使用した.

【結果】

① 免疫染色

Cochlin は蝸牛ではラセン靭帯やラセン板縁, 神経線維周囲の結合組織に, 前庭では Stroma や感覚細胞下の結合組織に発現を認めた. 一方, 蝸牛のコルチ器や血管条, ラセン神経節は染色されず, 同様に前庭の感覚細胞や暗細胞は染色されなかった. また蝸牛, 前庭ともラットの成長につれて発現部位にお

いて、Cochlin の染色が増強する傾向がみられた。また染色部位を細かくみると、Cochlin が細胞外マトリックスとして存在していることが明らかとなった。

② ウェスタンブロット

生後 6 日目ではほとんど Cochlin の発現は認められなかったが、成長するにつれて Cochlin の発現が増強することが明らかとなった。

【考案】

Cochlin は内耳蛋白の約 70% を占める、内耳に非常に豊富に存在する蛋白であるが、その機能については未だに不明な点も多い。Cochlin は細胞外マトリックスとして、蛋白間の相互作用に関係する蛋白と推測されている。今回の結果はその説に矛盾の無い結果となった。今まで、発達過程における内耳蛋白の発現について数多くの報告があり、特にマウスやラットを用いた報告が多い。その中でも、生後の発達 (postnatal development) 過程について調べてみると、生直後にすでに多く発現しているタイプ (tectorina⁷) など、生後 1~2 週間前後に発現が増強するタイプ (connexin, Na⁺-K⁺ ATPase, GLAST など) の他に、発現部位が移動するタイプ (AQP5 など) などもあり、発達過程における発現 (spatiotemporal expression) を検討することは、内耳蛋白の機能を推測する上で極めて意義が高い。今回の結果から、発現部位はカリウムイオンサイクルなどに密接に関係しているとされているラセン板縁、ラセン靭帯に発現を認めることが明らかとなった。また成獣レベルに到達する発現時期についても、connexin26 の生後 12 日目や、NA-K ATPase の生後 11 から 14 日目に比べるとやや遅いものの、生後 13 日から 17 日にかけて増加して生後 24 日目に成獣レベルに到達することから、イオンサイクルなど内耳のホメオスターシスに関係している蛋白である可能性が示唆された。一方で Cochlin のノックアウトマウスは生後 5 ヶ月までは聴力障害をきたさないという報告もあり、Cochlin が生後早期の聴覚機能に必須ではないことが示された。今後はノックインマウスでの検討や加齢モデルでの検討なども視野に入れて今後の研究を進めていく予定である。

【結論】

- ①: 生後 6 日目のラットでは Cochlin はほとんど発現していない。
 - ②: 生後の発達とともに徐々に発現してくる。
 - ③: コルチや血管条、前庭の感覚細胞には発現せず、ラセン靭帯やラセン板縁その他結合組織に細胞外マトリックスとして存在している。
- ことが明らかとなった。

【参考文献】

- 1) Ikezono T, Shindo S, et al. Expression of cochlin in the vestibular organ of rats. *ORL* 2005; 67: 252-258.
- 2) Robertson N G, Hamaker S A, et al. Subcellular localization, secretion, and post-translational processing of normal cochlin, and of mutants causing the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9. *J Med Genet* 2003; 40:479-486.
- 3) Trexler M, Banyai L, et al. The LCCL module, *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 5751-5757.
- 4) Ikezono T, Omori A, et al. Identification of the protein product of the COCH gene-hereditary deafness gene- as the major component of inner ear protein, *Biochim Biophys Acta* 2001; 1535: 258-265.
- 5) Li L, Ikezono T, et al. Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific. *Auris Nasus*

Larynx 2005; 32: 219-223.

- 6) Ikezono T, Shindo S, et al. Identification of a novel Cochlin isoform in the perilymph: insights to Cochlin function and the pathogenesis of DFNA9. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 6: 314: 440-446.
- 7) 福島 邦博ら. 発達過程のマウス内耳における Dfna5 遺伝子発現の量的変化. 厚生省特定疾患 急性高度難聴調査研究班平成 12 年研究業績報告書:13-14

9. CTP 検出法の検査システムの精度管理 (Quality Control)

池園哲郎, 新藤 晋, 李 麗淑, 関根久遠, 八木聰明
(日本医科大学耳鼻咽喉科)

[はじめに]

外リンパ瘻^{1) 2) 3) 4) 5) 6)}の確定診断は, 手術や内視鏡の所見により漏出もしくは瘻を確認することでなされる. しかし, 術中に外リンパの漏出が明らかに確認できる症例は多くはなく, 診断に術者の主観が入ることが以前から問題視されていた. この問題を解決するべく今までに外リンパ瘻の診断マーカーとして, B2-トランスフェリン^{7) 8) 9) 10) 11)}やβトレースプロテイン¹²⁾, GM1¹³⁾, AP30¹⁴⁾, 蛍光物質髄注¹⁵⁾などの候補物質が報告されていたが, いずれも検出率の低さと特異度の低さから臨床応用には至っていない. 我々は非症候性遺伝性難聴の一つ DFNA9 の病因蛋白の一つ Cochlin^{16) 17) 18) 19) 20) 21)}の研究を進めていく中で, Cochlin のアイソフォームの一つ CTP (cochlin-tomo-protein) が外リンパ特異的蛋白であることを発見した^{22) 23)}. CTP が外リンパ特異的蛋白であることを利用し, CTP 検出法を実際の臨床の場で外リンパ瘻の生化学的診断法として確立するのが本研究の目的である. そのため, 検査法の一つ一つのステップについて見直し, 感度, 特異度, 再現性を向上するべく研究を行った.

[対象と方法]

CTP 検出法の精度管理について以下のようなプランを計画, 実行した.

A 検査条件の設定

- (1) 抗体の作成 (より良い抗原決定基の選択)
- (2) プロット法 転写膜の選択
- (3) 化学発光検出試薬の選択
- (4) 画像解析法: LAS-3000 を用いた至適条件の設定

B. 標準品蛋白 (標品) としてのリコンビナント CTP 蛋白の作製
(検査の信頼性を高める上で, 標品は非常に重要である.)

C. 検体検出限界の測定および再現性の検討

- (1) 標品を用いた検出下限の決定および再現性確認
- (2) ヒト外リンパ段階希釈液の検体検出限界の測定

D. 臨床例における検討

[結果]

A 検査条件設定

(1) 抗体の作成

CTP 検出のために p63 抗体, LCCL1 抗体, LCCL2 抗体, LCCL3 抗体の計 4 種類の抗体を作成した. この 4 種類を比較検討したところ, 抗 LCCL3 抗体が最も優れていた.

(2) プロット法 転写膜の選択

①: プロット法の検討 ウェット法とセミドライ法の転写効率の比較では, セミドライ法が効率に優れることを確認した.

②: 転写膜の検討 ニトロセルロース膜及び PVDF 膜の検出感度への影響を調べた結果、ニトロセルロース膜は、バックグラウンドが高く、シグナルがシャープではなかった。一方、PVDF 膜はバックグラウンドも低く、シグナルもシャープに検出できた。

したがって、セミドライ法と PVDF 膜を組み合わせることとした。

(3) 化学発光検出試薬の選択

化学発光検出試薬について現在汎用されている、ECL plus, ECL Advance, Covalight, Luminescence Reagent kit の 4 種について検出感度について比較検討したところ ECL Advance がもっとも検出感度が良いことが判明した。

(4) 画像解析法: LAS-3000 を用いた至適条件の設定

ウェスタンブロットの結果の画像解析についても、従来のフィルムを使用した従来法では無く、LAS-3000 という化学発光を高感度に検出し、デジタル画像として経時的に定量できる画像解析装置を使用した。LAS3000 は従来法のように暗室操作や長時間の手作業による露光操作などの手間が無く、毎回最適な S/N 比の画像を得ることができる。これにより、画像解析に費やす時間と検査結果の信頼度は飛躍的に上昇した。

B. 標準品蛋白 (標品) としてのリコンビナント CTP 蛋白の作製

抗 Cochlin 抗体がペプチド抗体であったため、抗原 (標品) は糖鎖など修飾の無い大腸菌組換え蛋白で十分であると判断した。Cochlin 遺伝子は、Cochlin 全長 cDNA を包含する EST clone プラスミドより調製。塩基配列を調べ、変異点等のない野性型であることを確認した。リコンビナント CTP 蛋白は pCR T7/TOPO TA Expression Kits Version I (Invitrogen) を使用し作製した。

C. 検体検出限界の測定および再現性の検討

(1) 標品を用いた検出下限の決定および再現性確認

標品 (作成したリコンビナント CTP) を用いて、検出下限の確認を行った。その結果 1024 倍希釈標品まで陽性となった。この検出下限(a)と、その 1/2 量(b)を毎回サンプルとともに泳動し、(a) が陽性でかつ (b) が陰性であった検査を精度管理上問題無しと判定することにした。その条件での再現性を見たところ、同時・日間再現性も良好であった。

(2) ヒト外リンパ段階希釈液の検体検出限界の測定

ヒト外リンパを用いた、検出限界の測定を行なった。その結果、最大 128 倍希釈の外リンパ (1 μ l アプライ) でも陽性となることが判明した。実際のサンプルによるウェスタンブロットでは 12 μ l アプライするので、中耳洗浄液として回収する場合、生理食塩水 300 μ l で洗浄した時、中耳内に約 0.3 μ l の外リンパの漏出があれば検知可能であることを示す結果となった。

D. 臨床例における検討

まず、血清 28 例、髄液 8 例、唾液 4 例の計 40 例について検査を行い、全例陰性であることを確認した。次に陰性コントロールとして、アブミ骨手術開窓前 20 例、人工内耳手術開窓前 2 例、滲出性中耳炎滲出液 5 例、慢性中耳炎中耳洗浄液 15 例、伝音難聴中耳洗浄液 5 例、外耳道真珠腫 1 例、好酸球性中耳炎滲出液 2 例の計 50 例に検査を行い同様に全例陰性であることを確認した。さらに陽性コントロールとしてアブミ骨手術開窓後の外リンパ 27 例、人工内耳手術開窓後の外リンパ 7 例、さらに聴神経腫瘍術中に漏出した外リンパ 1 例について検査を行い全 35 例で陽性であることを確認した。

[考案・結論]

外リンパ瘻の診断マーカーについてはβ2-トランスフェリンやβトレースプロテイン, GM1, AP30, 蛍光物質髄注などの報告があるが, いずれもアブミ骨手術中に採取した外リンパでさえ陽性率はいずれも0~29%と非常に低く, 臨床応用に至っていない. 我々はCTPに着目し, 今まで外リンパ瘻の診断マーカーとしての可能性を報告してきた. そして検査法を改良し症例数を増やした本報告において, 実際に臨床応用可能な感度, 特異度, 再現性を実現し得たと考えている. また非特異的反応の少ない抗体の作成を計画するなど, 検査法の改良を追求し, 更なる検査の精度管理を進めていく予定である.

[参考文献]

- 1) Nomura Y. Perilymph fistula: concept, diagnosis and management. *Acta Otolaryngol* 1994; suppl 514: 52-54.
- 2) 吉岡邦英. 突発感音難聴における内耳窓破裂に関する臨床的並びに実験的研究. *耳展*:1983;26:補6,517-539.
- 3) Arrer E, Oberascher G, et al. Protein distribution in the human perilymph: a comparative study between perilymph (post mortem), CSF and blood serum. *Acta Otolaryngol* 1988; 106: 117-123.
- 4) 池園哲郎: 聴力改善手術 7.外リンパ瘻. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 77, No.(5): 162-173, 2005. Ikezono T, Shindo S, et al. Expression of cochlin in the vestibular organ of rats. *ORL* 2005; 67: 252-258.
- 5) Shea JJ. The myth of spontaneous perilymph fistula. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 107: 613-616.
- 6) Friedland DR, Wackym PA. A critical appraisal of spontaneous perilymphatic fistulas of the inner ear. *AM J Otol* 1999; 20: 261-279.
- 7) Bassiouny M, Hirsch BE, et al. Beta 2-transferrin application in otology. *Am J Otol* 1992; 13: 552-555.
- 8) Skedros DG, Cass SP, et al. Sources of error in use of beta-2 transferrin analysis for diagnosing perilymphatic and cerebral spinal fluid leaks. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 109: 861-864.
- 9) Weber PC, Kelly RH, et al. Beta 2-transferrin confirms perilymphatic fistula in children. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 110: 381-386.
- 10) Arrer E, Gibitz HJ. Detection of beta 2-transferrin with agarose gel electrophoresis, immunofixation and silver staining in cerebrospinal fluid, secretions and other body fluids. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25: 113-116.
- 11) Levenson MJ, Desloge RB, et al. Beta-2 transferrin: limitations of use as a clinical marker for perilymph. *Am J otol* 1999; 20: 174-178.
- 12) Bachmann G, Nekic M, et al. Traces of perilymph detected in epipharyngeal fluid: perilymphatic fistula as a cause of sudden hearing loss diagnosed with beta-trace protein (prostaglandin D synthase) immunoelectrophoresis. *J Laryngol Otol* 2001; 115: 132-135.
- 13) 神崎 仁, 井上康宏, 小川郁ら. GM1 を用いた外リンパ瘻診断の試み. 厚生労働省特定疾患対策研究事業・急性高度感音難聴に関する調査研究班・平成 11 年度報告書 2000, pp. 41-43.
- 14) Thalmann I, Kohut RI, et al. Protein profile of human disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111: 273-280.
- 15) Gehrking E, Wisst F, et al. Intraoperative assessment of perilymphatic fistulas with

intrathecal administration of fluorescein. *The Laryngoscope* 2002; 112: 1614-1618.

- 16) 池園哲郎: 「末梢前庭器から前庭神経核へ-最近の知見-」1.COCH 遺伝子とめまい. *Equilib Res* 64 (1) : 1-11, 2005.
- 17) Ikezono T, Omori A, et al. Identification of the protein product of the COCH gene-hereditary deafness gene- as the major component of inner ear protein, *Biochim Biophys Acta* 2001; 1535: 258-265.
- 18) Trexler M, Banyai L, et al. The LCCL module, *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 5751-5757.
- 19) Li L, Ikezono T, Watanabe A, Shindo S, Pawankar R, Yagi T.: Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific. *Auris Nasus Larynx.* 32(3): 219-23, 2005.
- 20) Robertson NG, Cremers CW, Huygen PL, Ikezono T, Krastins B, Kremer H, Kuo SF, Liberman MC, Merchant SN, Miller CE, Nadol JB, Jr., Sarracino DA, Verhagen WI, Morton CC.: Cochlin immunostaining of inner ear pathologic deposits and proteomic analysis in DFNA9 deafness and vestibular dysfunction. *Hum Mol Genet*, 2006.
- 21) Robertson N G, Hamaker S A, et al. Subcellular localization, secretion, and post-translational processing of normal cochlin, and of mutants causing the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9. *J Med Genet* 2003;40:479-486.
- 22) Ikezono T, Shindo S, et al. Identification of a novel Cochlin isoform in the perilymph: insights to Cochlin function and the pathogenesis of DFNA9. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 6: 314: 440-446.
- 23) 池園哲郎: 外リンパろうの診断マーカーとしての Cochlin-Tomoprotein(CTP). *臨床検査* 49(11): 1259-1263, 2005.

10. 内耳への薬物直接投与による内耳障害治療の研究

伊藤壽一

(京都大学大学院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学)

【研究要旨】

メニエール病などを含めた内耳障害の治療が困難な理由に、内耳への薬物投与の困難性が挙げられる。動物実験ではミニポンプを使用する方法やウイルスを薬物の担体として使用する方法があるが、いずれも内耳への侵襲という問題点もある。我々はこれまで生体吸収性徐放ゲルを用いた薬物投与方法を報告してきた。今回は、内耳保護薬物を用い、ゲルや高分子ポリマーを利用した内耳薬物投与方法と内耳障害保護への有効性を確認した。

【研究目的】

内耳の感覚細胞（有毛細胞）は一度障害を受けると回復することは難しく、そのために生じる感音難聴、高度の平衡障害は治療が困難となる。内耳に関してもこれまでいくつかの物質が感覚細胞保護、または再生に有効であると報告されている。しかし、細胞成長因子は一般にはタンパクであり、生体内では非常に不安定で、生体に投与しても直ぐ代謝され、期待する組織再生効果は得られないことが多い。またこれらの物質の投与方法として、例えば全身投与する場合は内耳に作用させるためには大量頻回投与しか方法が無く、薬物が正常細胞にも高濃度で作用することが考えられ、副作用の原因となる可能性がある。理想的には必要な物質を必要な部位に、必要な量だけ、適切な期間投与することである。動物実験では、浸透圧ポンプや遺伝子導入が神経栄養因子の投与方法として試みられており、その有用性が実証されている。しかし、これらの方法は限られた期間しか神経栄養因子を内耳に供給することができない。また実際の臨床応用を考えるに、逆に内耳の障害を助長する危険性もある。理想的には内耳に侵襲を与えず内耳保護に有用な薬物を投与するのが理想である。

われわれはこれまで徐放性のハイドロゲルに内耳保護作用のある薬物を組み込み、内耳に薬物が投与できるかを研究してきた。今回は実際内耳保護効果があると考えられる薬物をこの徐放性ハイドロゲルに組み込み、内耳障害動物モデルに投与し、内耳障害が軽減されるかを検討した。

【研究方法】

内耳保護作用があると考えられる薬物として、BDNF (brain-derived neurotrophic factor)、IGF (insulin like growth factor)を用いた。ゲンタマイシンとエタクリン酸で内耳に障害を与えたモルモットを実験動物として用いた。動物に上記薬物で障害を与えた後、BDNF または IGF を組み込んだ徐放性ハイドロゲルをモルモットの正円窓に留置した。留置後7日後、14日後、21日後に動物を屠殺し、内耳を摘出し、コルチ器内の有毛細胞の障害の度合い、またラセン神経節細胞の障害の度合いをコントロール（内耳障害を与え、神経栄養因子を投与しなかった群）のものと比較検討した。なお、動物を屠殺する前に、聴覚機能検査を聴性脳幹反応（ABR: auditory brain stem response）または電気刺激聴性脳幹反応（EABR: electrically stimulated auditory brain stem response）にて検討した。

なお、以上の研究は京都大学動物実験倫理委員会の規定に従った。

【結果】

徐放性ハイドロゲルハイドロゲルにBDNF組み込み内耳に投与すると、投与後7日、14日、21日の

時点で内耳ラセン神経節細胞の障害はコントロールに比べ有意に減少した。これは蝸牛各回転を支配するラセン神経節細胞全てで同様の結果であった。また EABR の結果では、投与後 7 日、14 日、21 日の時点でコントロールに比べ閾値上昇が抑えられた。一方徐放性ハイドロゲルハイドロゲルに IGF 組み込み内耳に投与すると、投与後 7 日、14 日、21 日の時点で内耳有毛細胞の障害はコントロールに比べ有意に減少した。これは蝸牛全回転で同様の結果であった。また ABR の結果では、投与後 7 日、14 日、21 日の時点でコントロールに比べ閾値上昇が抑えられた。

[考察]

内耳の各細胞を保護する可能性のある薬物はこれまでもいくつか報告されている。しかしこれまで内耳に薬物を投与する場合は絶えずその投与経路が問題であった。全身投与の際は、血液内耳関門の存在のため、有効に内耳に薬物が到達しない。また内耳への局所投与を行っても、ポンプなどの器具を使用する場合は内耳への侵襲が問題となり、結果的に内耳障害を助長する。今回我々は徐放性ハイドロゲルに薬物を組み込み、内耳へ薬物を投与した。その結果この薬物が内耳障害を保護することが組織学的、機能的に証明された。これにより内耳の有効に薬物を投与する方法が開発されたと考えられる。

[結論]

内耳という特殊な解剖学的構造、特殊なバリアー（ blood cochlear barrier ）などの存在により内耳に薬物を局所投与することは難しいとされてきた。また仮にうまく投与されても脳脊髄液方向に流出してしまうなど、効果を発揮するには至らない結果が報告されている。今回紹介した徐放システム、特に徐放性ハイドロゲルを用いた BDNF、IGF などの神経栄養因子は内耳保護作用を有することが判明した。このような薬物投与方法、薬物徐放の可能性のある細胞の移植などは内耳障害への新しい治療方法への可能性を示すものとして期待される。

[参考文献]

- 1) 伊藤壽一 内耳への新しい薬物投与方法 —徐放性ドラッグデリバリーシステム— 耳鼻臨床 98,1-4, 2005